

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 06-293645

(43)Date of publication of application : 21.10.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/70  
// C07H 19/10  
C07H 19/20  
C12N 9/99

(21)Application number : 05-083391

(71)Applicant : SANEYOSHI MINERO  
SHUDO KOICHI

(22)Date of filing : 09.04.1993

(72)Inventor : SANEYOSHI MINERO  
SHUDO KOICHI**(54) REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a reverse transcriptase inhibitor having a strong inhibitory effect on a reverse transcriptase produced by HIV and useful for improvement and prevention of AIDS and for suppression or retardation of the crisis after infection with AIDS virus.

**CONSTITUTION:** There is provided a reverse transcriptase inhibitor containing 2'-deoxy-L-ribonucleotide-5'-triphosphate, preferably 2'-deoxy-L-thymidine-5'-triphosphate as the active component and having a strong inhibitory effect on a reverse transcriptase produced by retrovirus. This compound can be produced by converting an L-nucleotide (an optical antipode of a natural type nucleotide) into its monophosphate, e.g. in the presence of phosphorus oxychloride and subsequently synthesizing its corresponding 5'-triphosphate compound therefrom, e.g. according to phosphorimidazolidate method. This compound is also useful as a reagent for studies in the fields of biochemistry, genetic engineering etc.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 07.04.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3693357

[Date of registration] 01.07.2005

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-293645

(43) 公開日 平成6年(1994)10月21日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	AD Y	8314-4C		
// C 0 7 H 19/10				
19/20				
C 1 2 N 9/99				

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平5-83391	(71) 出願人	593070147 実吉 峯郎 東京都八王子市散田町1-7-7-305
(22) 出願日	平成5年(1993)4月9日	(71) 出願人	000182432 首藤 紘一 東京都目黒区東山2丁目25番6-102号 公務員宿舎
		(72) 発明者	実吉 峯郎 東京都八王子市散田町1-7-7-305
		(72) 発明者	首藤 紘一 東京都目黒区東山2丁目25番6-102号公 務員宿舎
		(74) 代理人	弁理士 今村 正純

(54) 【発明の名称】 逆転写酵素阻害剤

(57) 【要約】

〔構成〕 2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド  
5'-トリリン酸、例えば2'-デオキシ-L-チミジ  
ン 5'-トリリン酸を有効成分として含む逆転写酵素  
阻害剤。

〔効果〕 レトロウイルス、例えばHIVの産生する逆  
転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や予防、な  
らびにエイズ・ウイルス感染後の発病抑制・遅延に有用  
である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用  
いられる試薬としても有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリリン酸を有効成分として含む逆転写酵素阻害剤。

【請求項2】 2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリリン酸を有効成分として含む請求項1記載の逆転写酵素阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、逆転写酵素阻害剤に関する。さらに詳しくは、本発明は、エイズウイルス(HIV:ヒト免疫不全ウイルス)等のレトロウイルスが産生する逆転写酵素を阻害し、後天性免疫不全症候群(AIDS, エイズ)の治療や感染後の発病抑制に有用な逆転写酵素阻害剤に関する。

【従来の技術】従来、天然型ヌクレオシドの光学対掌体(エナンチオマー)である非天然型エナンチオヌクレオシドが種々合成されてきた。これらのうち、L型ヌクレオシドに属する3'-チア-2'-デオキシ-L-シチジン(3TC, Antimicrob. Agents Chemother., 36, 1688-1694, 1992)および3'-チア-2'-デオキシ-5-フルオロ-L-シチジン(FTC, Antimicrob. Agents Chemother., 36, 2423-2431, 1992)には強い抗HIV活性が報告されている。また、L-チミジンが、単純ヘルペスウイルスI型にコードされるチミジンキナーゼによってリン酸化され、感染細胞中におけるウイルスの複製を阻害することが報告されている(J. Med. Chem., 35, 4214-4220, 1992)。

## 【0002】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】本発明者は、2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリリン酸を製造してその生物活性を検討したところ、この化合物がレトロウイルスの産生する逆転写酵素を強く阻害することを見出し、本発明を完成するに至った。本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にHIVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や予防、ならびにエイズ・ウイルス感染後の発病抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用いられる試薬としても有用である。本発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分として含まれる2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリリン酸としては、例えば、2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリリン酸; 2'-デオキシ-L-ウリジン 5'-トリリリン酸; 2'-デオキシ-L-アデノシン 5'-トリリリン酸; 2'-デオキシ-L-グアノシン 5'-トリリリン酸; 2'-デオキシ-L-シチジン 5'-トリリリン酸等の天然型2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-トリリリン酸の光学対掌体、および2'-デオキシ-L-5-フルオロウリジン 5'-トリリリン酸等の非天然型2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-

トリリリン酸の光学対掌体を挙げるができる。

【0003】本発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分として含まれる2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリリン酸は、L-チミジン等のL-ヌクレオシド(天然型ヌクレオシドの光学対掌体)を、例えばオキシ塩化りん等により5'-モノりん酸化体とした後、例えばホスホロイミダゾリデート法によって対応する5'-トリリリン酸化体とすることにより製造することができる。本発明の逆転写酵素阻害剤を、例えばHIVウイルス等のレトロウイルスの関与する疾患などの治療や予防、またはレトロウイルス感染後の発病抑制あるいは遅延のための医薬として用いることができる。この場合には、上記の2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリリン酸を有効成分として含む医薬組成物として患者に投与すればよい。医薬組成物としては、例えば、カプセル剤、錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等の経口投与用組成物、あるいは注射剤、坐剤、点眼剤、眼軟膏、点耳剤、または外皮用剤等の非経口投与用組成物を挙げるができる。これらの医薬用組成物は常法により製造できるが、必要により薬理学的、製剤学的に許容しうる添加物を加えて製造してもよい。

【0004】経口剤及び坐剤の製造には、乳糖、D-マンニトール、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等の賦形剤; カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤; ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤; ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤; ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、酸化チタン等のコーティング剤; 又はポリエチレングリコール、ハードファット等の基剤を製剤用成分として使用すればよい。注射剤あるいは点眼、点耳剤の製造には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型剤型を構成しうる溶解剤ないし溶解補助剤; 無機又は有機の酸あるいは塩基のpH調節剤; 食塩、ブドウ糖、グリセリン等の等張化剤; 又は安定化剤等の製剤成分を使用すればよい。眼軟膏剤、外皮用剤の製造には、白色ワセリン、マクロゴール、グリセリン、綿布等の軟膏剤、クリーム剤、貼付剤に汎用される適切な製剤成分を使用すればよい。本発明の逆転写酵素阻害剤を医薬組成物として用いる場合には、例えば、成人の患者に対して、有効成分である2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリリン酸の一日あたり投与量が0.1~1,000 mg/kg程度となるように投与すればよいが、治療や予防の目的や患者の年齢や症状により適宜増減してもよい。

## 【0005】

【実施例】以下、本発明の好ましい態様である2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリリン酸についてさらに具体的に説明するが、本発明はこの化合物およびこれらの実施例に限定されることはない。

例1: 2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸の製造

L-チミジン20mg (0.083ミリモル) をりん酸トリエチル1mlに溶解し、-10℃に冷却した後、オキシ塩化りん50μlを添加した。4℃にて16時間反応させた後、反応液を1M炭酸水素ナトリウム水溶液2mlに攪拌しながら注いだ。中和後、水を添加して全量を50mlに希釈した後、クロロホルム10mlで3回洗浄した。水層をDEAE-セルロース(3cm I.D. × 7 cm, Whatman DE-52)に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカーボネートの直線濃度勾配(0-0.3M, 500ml×2)で溶出した。5'-モノりん酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'-デオキシ-L-チミジン 5'-モノりん酸(L-dTMP)を得た。505 OD<sub>267</sub> (0.1N HCl) 収率 63%

【0006】 2'-デオキシ-L-チミジン 5'-モノりん酸 475 OD<sub>267</sub> をジメチルホルムアミドに溶解し、カルボニルジイミダゾール40.5mgを添加後、室温にて3.5時間攪拌した。メタノール15.4μlを添加して30分攪拌した後、ピロリン酸トリブチルアミン塩ジメチルホルムアミド溶液(0.6ミリモル/ml) 1mlを添加し室温で24時間攪拌した。反応液を減圧乾固した後、残渣を水50mlに溶解して、活性炭1グラムを添加した。穏やかに10分間攪拌した後に濾過し、残渣に水50mlを添加して溶解した。この溶液をDEAE-セルロース(3cm I.D. × 7 cm, Whatman DE-52)に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカーボネートの直線濃度勾配(0-0.5M, 500ml×2)で溶出した。5'-トリリン酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸(L-dTTP)を得た。370 OD<sub>267</sub> (0.1N HCl) 収率7\*

\* 8%

UV吸収スペクトル: λ max 267 nm (H<sub>2</sub>O)

りん原子含量 : 計算値 ε(p) 267 nm (H<sub>2</sub>O)= 3,200

実測値 ε(p)=2,900

HPLC分析 : 保持時間 6.8分 純度97%  
カラム YMCODS A-302逆相樹脂、水-アセトニトリルおよび1Mトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液(pH 7.0)(78:2:20, v/v/v)、流速1ml/分、50℃。

【0007】 例2: 試験例

上記の2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸(L-dTTP)を用いて真核生物およびウイルスのDNAポリメラーゼに対する作用を検討した。ポリメラーゼとしては、コウシ胸腺DNAポリメラーゼα(Pol α)、ラットDNAポリメラーゼβ(Pol β: Date, T., et al., Biochemistry, 27, 2983-2990, 1988)、ウシ肝臓DNAポリメラーゼγ(Pol γ: Izuta, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 776-783, 1991)、およびHIV-1由来のレトロウイルス逆転写酵素(HIV-1 RT)を用いた。DNAポリメラーゼβとレトロウイルス逆転写酵素は、遺伝子組換えにより大腸菌で生産、精製された酵素である。酵素活性測定は、以下の表1に示す条件を用い、各ポリメラーゼを37℃で20分間インキュベートした後、反応液を冷却してDE 81イオン交換紙に吸着させ、5%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>で6回、つづいて水で2回洗浄した後、イオン交換紙を乾燥して放射活性を測定することにより行った。

【0008】

【表1】

	HIV-1 RT	Pol α	Pol β	Pol γ
50 mM Tris-HCl	pH8.3	pH7.5	pH8.8	
40 mM KPi				pH7.5
MnCl <sub>2</sub>	0.5 mM		0.5 mM	0.5 mM
MgCl <sub>2</sub>		4 mM		
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
BSA	100 μg/ml	400 μg/ml	400 μg/ml	400 μg/ml
KCl	50 mM		100 mM	50 mM
ポリ[rA]	20 μg/ml		40 μg/ml	40 μg/ml
オリゴ[dT]	10 μg/ml		40 μg/ml	10 μg/ml
活性化DNA		100 μg/ml		
[ <sup>3</sup> H]dTTP	50 μM	50 μM	50 μM	50 μM
dATP		100 μM		
dCTP		100 μM		
dGTP		100 μM		
酵素量(ユニット)	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6

【0009】 上記の各DNAポリメラーゼに対する2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸(L-d

TTP)の作用を50  $\mu$ M dTTP存在下で検討した。対照として、抗HIV剤として周知の3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)の5'-トリリン酸塩体(AZT-TP: Ono, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 498-507, 1986)および $\alpha$ -dTTP(Yamaguchi, T., et al., Chem. Pharm. Bull., 32, 1441-1450, 1984)を用いた。Pol  $\alpha$ の鋳型プライマーとして活性化DNAを用いた場合、L-dTTPによる阻害効果はほとんど認められず、Pol  $\beta$ に対しても、ポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いた場合には、わずかな阻害が認められるにすぎなかった。一方、Pol  $\gamma$ に対しては、L-dTTPによる阻害効果が認められたが、AZT-TPと比較すると、その阻害活性はやや低かった。また、 $\alpha$ -dTTPはPol  $\gamma$ に対して弱い阻害作用を示した。レトロウイルス逆転写酵素の活性測定に頻用されるポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いると、L-dTTPはHIV-1 RTに対して強い阻害作用を示した。結果を図1ないし図4に示す。図4に示されたL-dTTPのHIV-1 RTに対する阻害効果について、ラインウィーバー・バーク・プロットで酵素阻害様式を検討したところ、L-dTTPは基質であるdTTP

Pと拮抗阻害することが示された。HIV-1 RTに対するL-dTTPの $K_i/K_m$ 値は0.07であり、L-dTTPはHIV-1 RTに対して、基質のdTTPよりも約14倍高い親和性を示した。

【0010】

【発明の効果】本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にHIVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や感染後の発病抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用いられる試薬としても有用である。

【図面の簡単な説明】

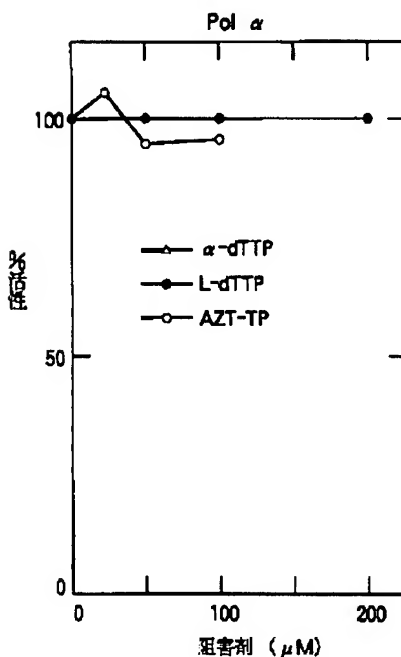
【図1】 コウシ胸腺DNAポリメラーゼ $\alpha$ (Pol  $\alpha$ )に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図2】 ラットDNAポリメラーゼ $\beta$ に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

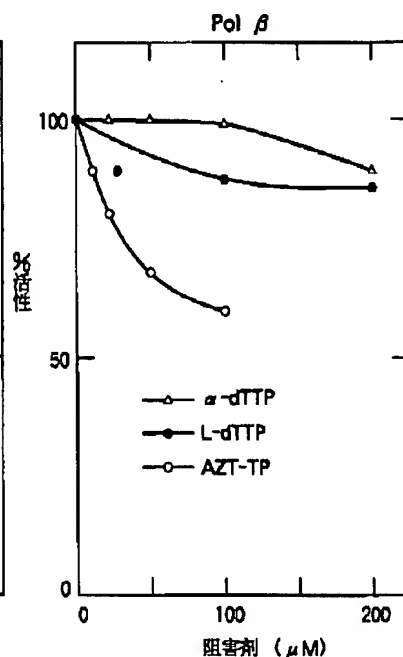
【図3】 ウシ肝臓DNAポリメラーゼ $\gamma$ に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図4】 HIV-1由来のレトロウイルス逆転写酵素(HIV-1 RT)に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

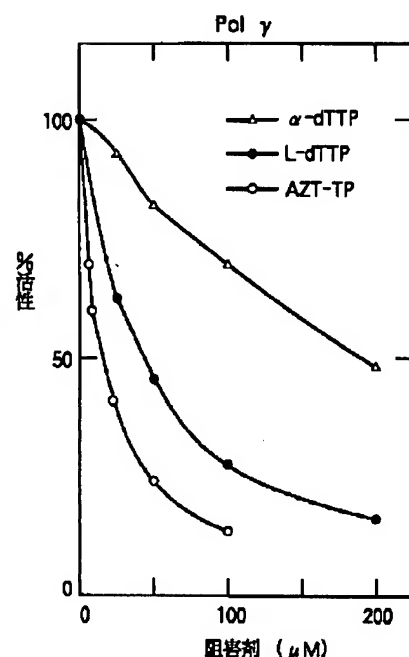
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

